

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2000093167 A**

(43) Date of publication of application: **04 . 04 . 00**

(51) Int. Cl

**C12N 3/00**  
**A01N 63/02**  
**/(C12N 3/00 , C12R 1:885 )**

(21) Application number: **10271080**

(22) Date of filing: **25 . 09 . 98**

(71) Applicant: **OUBIKEN:KK SASAKI**  
**YASU HARU**

(72) Inventor: **HORIUCHI ISAO**  
**KATAGIRI MIKIYUKI**  
**SASAKI YASU HARU**

(54) **CHLAMYDOSPORE OF TRICHODERMA**  
**HARZIANUM, ITS PRODUCTION AND**  
**MICROBIAL MATERIAL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new chlamydospore of *Trichoderma harzianum*, usable as a microbial material or the like capable of suppressing pathogenic bacteria by readily germinating only by the impartment of water by removing nutrients from the mycelium of *Trichoderma harzianum*, culturing the obtained *Trichoderma harzianum* in a liquid starvation medium containing no vitamins, and separating the cultured material, and.

SOLUTION: This new chlamydospore of *Trichoderma*

*harzianum* obtained by removing nutrients from the mycelium obtained by culturing the *Trichoderma harzianum*, normally culturing the obtained *Trichoderma harzianum* in a liquid starvation medium containing no vitamins, and separating the cultured material, is useful as a microbial material or the like having activities capable of suppressing pathogenic bacteria by performing ready and active germination only by the impartment of water. The chlamydospore of the *Trichoderma harzianum* is obtained by culturing the *Trichoderma harzianum* in a nutrient medium, separating the mycelium from the nutrient medium, culturing the mycelium after removing the nutrient components in the liquid starvation medium, and separating the mycelium.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-93167

(P2000-93167A)

(43) 公開日 平成12年4月4日 (2000. 4. 4)

(51) IntCl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テロト (参考)
C 1 2 N 3/00		C 1 2 N 3/00	4 B 0 6 5
A 0 1 N 63/02		A 0 1 N 63/02	D 4 H 0 1 1
// (C 1 2 N 3/00			
C 1 2 R 1:885)			

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平10-271080	(71) 出願人	595175301 株式会社応微研 山梨県東八代郡石和町井戸242
(22) 出願日	平成10年9月25日 (1998. 9. 25)	(71) 出願人	398023782 佐々木 康晴 札幌市中央区大通西18丁目1番地3 オリ ンピア大通西18丁目マンション702号
		(72) 発明者	堀内 勲 山梨県東八代郡石和町井戸242 株式会社 応微研内
		(74) 代理人	100059281 弁理士 鈴木 正次 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリコデルマハルジアナムの厚膜孢子及びその製造方法並びに微生物資材

(57) 【要約】

【課題】 この発明は、トリコデルマハルジアナムの厚膜孢子を工業的に多量生産し、その収量を増大させることを目的としたものである。

【解決手段】 トリコデルマハルジアナムを培養して得た菌糸体をビタミン類を含まない液状飢餓培地で通常環境のもとに飢餓培養して分離したことを特徴とする厚膜孢子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 トリコデルマハルジアナムを培養して得た菌糸体から栄養成分を除去し、これを、ビタミン類を含まない液状飢餓培地で通常培養して分離したことを特徴とするトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子。

【請求項2】 トリコデルマハルジアナムを栄養培地で培養した後、該栄養培地から菌糸体を分離し、ついで分離した菌糸体から栄養成分を除去し、この栄養成分を除去した菌糸体を液状飢餓培地で培養した後、厚膜胞子を分離することを特徴としたトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子の製造方法。

【請求項3】 飢餓培地はビタミン類を、添加しないと共に、ビタミン類を含む原料を添加しないことを特徴とした請求項2記載のトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子の製造方法。

【請求項4】 飢餓培地の培養は、通常培養と同一環境内で行うことを特徴とした請求項2記載のトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子の製造方法。

【請求項5】 請求項1記載のトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子を有効成分として含むことを特徴とした微生物資材。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は、通常培養で得た菌糸体を液状飢餓培地で培養し、効率よく厚膜胞子を得ることを目的としたトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子及びその製造方法並びに微生物資材に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来菌糸体微生物には、微量の厚膜胞子が含まれていることが知られていた。前記厚膜胞子は、環境対応性が高く、低温はもとより、高温においても対抗性が高いことが知られていた。またニンビヤ スシルピコラK-004 (FERMBP-4448)の厚膜胞子及びその誘導培地に関する発明の提案がある(特開平7-303481号)。

【0003】 更に本特許出願人は、先に菌糸体微生物を飢餓培養して厚膜胞子を製造する発明を提案した(特願平10-203876号)。

## 【0004】

【発明により解決しようとする課題】 前記に示した天然に存在する厚膜胞子は、極めて微量である為に、これを有効使用できる程多量に集めて有効利用することは至難であった。

【0005】 また前記公開発明に示された培地では、当該微生物には適応性があっても、一般に知られている菌糸体微生物の厚膜胞子を高い効率で多量生産することは困難であった。

【0006】 前記出願人の先願発明は、一般的菌糸体微生物の厚膜胞子を多量生産できる点で劃期的であり、工業化により多大の効果が期待できるのであるが、より効

率よく多量生産するについて改善の余地があった。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 前記問題点の改善に鑑み、本発明者等は、トリコデルマハルジアナムについて鋭意研究の結果、液状飢餓培地による培養が可能であり、その培養環境は普通環境で十分生育できる知見を得ると共に、飢餓培地にビタミン無添加で厚膜胞子が効率よく多量生産できる知見を得て更に研究の結果、この発明を完成したのである。

【0008】 即ちこの発明は、トリコデルマハルジアナムを培養して得た菌糸体から栄養成分を除去し、これを、ビタミン類を含まない液状飢餓培地で通常培養して分離したことを特徴とするトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子である。

【0009】 次に方法の発明は、トリコデルマハルジアナムを栄養培地で培養した後、該栄養培地から菌糸体を分離し、ついで分離した菌糸体から栄養成分を除去し、この栄養成分を除去した菌糸体を液状飢餓培地で培養した後、厚膜胞子を分離することを特徴としたトリコデルマハルジアナムの厚膜胞子の製造方法であり、飢餓培地はビタミン類を、添加しないと共に、ビタミン類を含む原料を添加しないものである。また飢餓培地の培養は、通常培養と同一環境内で行うものである。更に他の発明は、トリコデルマハルジアナムの厚膜胞子を有効成分として含むことを特徴とした微生物資材である。

【0010】 この発明で使用する栄養培地は、公知のLeonian培地と、ポテトデキストロース培地などを使用することができる。

【0011】 次にこの発明で使用する飢餓培地としては、ショ糖(又はグルコース、マルトース等の炭素源)、 $\text{KNO}_3$ (又は $\text{NaNO}_3$ 等の窒素源)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 及び水よりなるビタミン類を含まない液状飢餓培地が有効である。

【0012】 この発明の微生物資材は、炭酸カルシウム、脱脂した米ぬか及びびふすまを重量比で1:1:1で混合して微粉碎し、これに拡散剤(例えば市販の「エーロゾルOT」(商標)、和光純薬工業株式会社)、展着剤(例えば市販の「新リノー」(商標)、日本農薬株式会社)を加え、これに同量のパーライトを混合し、厚膜胞子を加えたものである。

【0013】 前記混合物の割合も重量比で1:1:1の混合比に限定されることはない。即ち厚膜胞子の発芽、成長に際しての栄養源としての役割を果たすものとなっていれば良いので、発芽環境に応じて適宜選択する。また前記混合物を、水分を6%~12%にして、一定量宛カプセルに封入し、製品とすれば、保存、移送及び使用に便利である。

【0014】 前記栄養成分はこれに限定されることな

く、厚膜胞子の発芽、成長に資するものは適宜使用し、かつ割合を変えることができる。前記栄養成分に加入する厚膜胞子の量は、使用目的に応じ、0.01%（重量）～100%（重量）の割合に混入し、あるいは施用処理物によって1～1万倍に希釈される場合もあるが、何れにしても、保存中又は輸送中の資材は、水分を6%～12%に保ち、中途の発芽を未然に防止する必要がある。

【0015】前記のように、施用条件によって厚膜胞子量が著しく相違するのは、施用後の発芽増殖の見込みにより異なるからである。今後の継続的研究により病原菌の種類、施用環境、発芽増殖の可能性など、各種実験を経ることにより、最も経済的かつ有効な使用方法が判明することになる。

【0016】この発明が提案する厚膜胞子は、菌糸体微生物を飢餓培養して得た厚膜胞子を施用処理物へ0.01～100重量%混入させ、若しくは前記厚膜胞子を施用処理物で1～1万倍に希釈して使用する。ここで、厚膜胞子を施用処理物へ混入し、あるいは、厚膜胞子を施用処理物で希釈する前記範囲の下限は、厚膜胞子を発芽させて病原微生物の活動を抑えるという効果を期待する上で、最低でもこの程度の割合とすることが好ましいものであり、前記上限を越えても効果に大きな差が生じなくなることから定められるものである。なお、この範囲において、費用対効果の観点から検討して、最も好ましい範囲は、厚膜胞子を施用処理物へ1～20重量%混入させ、若しくは厚膜胞子を施用処理物にて5～100倍に希釈して使用する場合である。

【0017】前記における施用処理物は、厚膜胞子の栄養源となる物質を含むようにして構成することが好ましい。栄養源を、例えば、0.1～1.0μm程度のサイズに微粉碎し、これを含めて前記施用処理物を構成しておけば、栄養素が吸収されやすくなり、厚膜胞子の発芽、成長にとって有利である。

【0018】この発明における厚膜胞子とは、菌糸体の先端または中間の細胞に貯蔵物質が集積して、形が大きく、しかも細胞壁が厚くなり、多くは壁が二重化した無性胞子である。また不適切な環境に耐えて生きるための胞子であって、本来は分散、生殖細胞的意味の胞子ではないが、固体に多数生じる場合には増殖にも役立つことが判明した。

【0019】この発明による厚膜胞子の収率は $3 \times 10^7$ 個/ml以上であって、先願発明より更に高収率である。また厚膜胞子の土壌中における発芽率は50%～99%であった。

【0020】この発明における厚膜胞子は、熱耐性が大きく、例えば-5℃～+70℃位までは、保存中に破壊されるおそれはない。尤も瞬間的には100℃でも耐えられることが判明した。従って、この発明の厚膜胞子は、地球上における通常の生物生活温度に耐え得るとい

うことであり、特に微生物使用地帯又は使用時期の温度は15℃～40℃程度であるから、厚膜胞子を多量生産し、地球上の如何なる場所へ発送しても輸送中の熟条件によって失効を招くおそれはなく、発芽率低下のおそれもない。

【0021】ただし、この発明の厚膜胞子は、保存中あるいは輸送中などにおける発芽を防止するために、保存中、輸送中などにおいては、その水分が6%～12%の範囲におさまるように取り扱う必要がある。

【0022】従来、病原微生物の活動を抑える有用な微生物は各種提案されていたが、何れも菌糸体及び分生胞子を使用していたので、発芽率が悪いのみならず、輸送又は保存中の熱管理不十分の為に、一層発芽が悪くなり十分の効力を発揮できない場合があり、効力の安定性について不十分であった。

【0023】しかしながら、病原微生物の活動を抑える有用な微生物の厚膜胞子を用いることにより、輸送又は保存の後であっても、少なくとも厚膜胞子は予定通り発芽してその性能を十分発揮することができるので、病原微生物の活動を抑えるという効果の安定性が保たれることが判明した。

【0024】一般に病原微生物の活動を抑える有用な微生物は、化学農薬と比較して下記のように幾多の利点がある。

【0025】1. 病原微生物に対する選択性が高く、生態系を乱す恐れがない。

2. 作物に被害を生じるおそれがない。

3. 人畜・魚介類に対し危害がない。

4. 病害虫の病原菌に対する抵抗性を与えない。

5. 水や土壌や作物への汚染や蓄積がない（長期使用による耐性の生成がない）。

【0026】前記において、特に病原微生物に対する抵抗性を与えない点は、長期間使用しても効力の減少又は消滅がないことを意味し、微生物の使用に重要な特性である。

【0027】例えば土壌菌から抽出し、又はその生成物を利用する抗生物質は、人類を病気から護る点で抜群の効果があるが、これを連続して使用することによって病原菌に耐性を付与し、抗生物質に耐性のある病原菌が出て来ているので、これに対し新規抗生物質の開発を余儀なくさせていることは、しばしば経験する所である。この一点だけでも厚膜胞子が如何に優れているかが判る。

【0028】前記厚膜胞子の製品化については、単独又は分生胞子と混合してマイクロカプセルに封入したり、あるいは顆粒化、錠剤化、微粉化するなど、従来公知の商品形態は何れも使用することができる。この発明の厚膜胞子は、水分が6%～12%の範囲におさまるような乾燥状態で保存することが唯一の条件であり、長期保存（1年以上）であっても、乾燥状態におけば、発芽率の低下は認められなかった。

10

20

30

40

50

## 【0029】

【実施例】トリコデルマハルジアナムSK55 (FERM BP4346) を、タンク内の下記培地に接種し、48時間、15℃～30℃で好気的に培養した後、前記培地から菌糸体（例えば5μ以下の大きさ）を分離し、菌糸体の5倍～100倍の滅菌した水又は生理食塩水に入れて洗浄し、菌糸体の表面に付着している栄養分を悉く除去する。

## 【0030】栄養培地の配合割合

グルコース	6.25 g
麦芽エキス	6.25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 g
酵母エキス	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.625 g
ペプトン	0.625 g
蒸留水	1000ml

前記のようにして栄養分を除去した菌糸体を、下記飢餓培地に接種し、72時間～170時間、15℃～30℃で好気的に培養した。

## 【0031】飢餓培地の配合割合

ショ糖	20 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub>	2.0mg
CuCl <sub>2</sub>	0.1mg
FeSO <sub>4</sub>	0.2mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.2mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01mg
蒸留水	1000ml

前記のようにして培養したならば、マイクロフィルターにより篩い分ける（例えば大きさ5μ～10μの厚膜胞子を分離する）。

【0032】前記と同一条件で数回実験した所、厚膜胞子の収量は、3×10<sup>7</sup>個/ml以上であった。この発明において、極限環境（温度、pH）における厚膜胞子の形成率は、通常の条件に比べて悪いことを確認した。\*

\*【0033】（実験例）前記実施例と同様に通常培養した菌糸体から栄養分を洗除した後、下記飢餓培地に接種し、72時間～170時間、15℃～30℃で好気的に培養した。

## 【0034】飢餓培地の配合割合

ショ糖	20 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub>	2.0mg
CuCl <sub>2</sub>	0.1mg
FeSO <sub>4</sub>	0.1mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.2mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01mg
ビオチン	4.0mg
チアミン	2.0mg
蒸留水	1000ml

前記培養後、厚膜胞子を分離した所、5×10<sup>6</sup>個/ml以下であった。前記によりビタミン類の添加によって厚膜胞子の収量が低下することが明らかとなった。

【0035】前記ビタミンは、少量（例えば1/2以下）ならば添加しても収量に影響がないのか、少しでもあれば収量に影響があるのか、不明である。更に培養環境を飢餓環境（例えば温度を35℃～45℃としたり、pHを5～4にする）とする必要がないことは確認したが、培養環境の変化による影響については今後の研究課題となる。

## 【0036】

【発明の効果】この発明は液状飢餓培地を用いると共に、飢餓培地にビタミン類を含ませないようにしたので、厚膜胞子の収量を著しく増大させた効果がある。

【0037】また飢餓培地による培養環境を通常環境（一般栄養培地による培養環境）としたので、厚膜胞子の培養が容易となり、かつ容易に多量の厚膜胞子を製造し得る効果がある。この発明の微生物資材は、必要な場所に散布し、水分を付与するのみで厚膜胞子が容易かつ活性のある発芽をして病原菌を制圧できる効果がある。

フロントページの続き

(72)発明者 片桐 幹之  
山梨県甲府市新田町17-38 ヴィルフォー  
レアマノ206 ※

※(72)発明者 佐々木 康晴  
北海道札幌市中央区大通西18丁目1番地3  
オリンピア大通西18丁目マンション702  
号

Fターム(参考) 4B065 AA70X AC20 BA23 BB31  
CA60  
4H011 AA01